

谷晓东,李素萍,杨柳青,等.红谷黄酒发酵过程中微生物多样性与理化指标、挥发性风味的相关性分析[J].食品工业科技,2022,43(23):133-143. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020255

GU Xiaodong, LI Suping, YANG Liuqing, et al. Correlation Analysis between Microbial Diversity and Physicochemical Indexes, Volatile Flavor during the Fermentation of Red Millet Huangjiu[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(23): 133-143. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020255

· 生物工程 ·

红谷黄酒发酵过程中微生物多样性与理化指标、挥发性风味的相关性分析

谷晓东¹,李素萍¹,杨柳青²,刘怡琳²,马艳莉^{1,2,*},陈志周^{1,3,*},王印壮¹,刘旭¹

(1.河北农业大学食品科技学院,河北保定 071000;

2.南阳理工学院张仲景国医国药学院,河南南阳 473004;

3.河北农业大学机电工程学院,河北保定 071001)

摘要:为探究红谷黄酒发酵过程中微生物群落与理化指标、挥发性风味之间的相关性,本研究通过微生物高通量测序技术、理化指标检测及气相色谱-质谱技术等对黄酒样品进行测定并用 SPSS 软件进行相关性分析。结果显示随着发酵的进行,还原糖含量在初期急剧下降后逐渐稳定,酒精度变化与之相反;总酸含量先快速增加后减少再增加,pH 较为稳定;氨基酸氮含量先波动增加后急剧上升,可溶性固形物含量先剧烈下降后趋于稳定。发酵过程中 10 次取样(1~7、10、20、30 d)共检测出 14 个细菌门和 228 个细菌属;7 个真菌门和 108 个真菌属。在属水平细菌群落可聚类为 3 类,真菌群落可聚类为 5 类。细菌属水平与总酸显著正相关($P<0.05$),与还原糖显著负相关($P<0.05$),真菌属水平与氨基酸氮显著正相关($P<0.05$)。2,3-丁二醇以及乳酸乙酯与大部分菌属显著正相关($P<0.05$)。*Klebsiella* 与辛酸乙酯显著负相关($P<0.05$);*Lactococcus* 与乙醇、2-丁醇、异丁醇、苯乙醇和棕榈酸乙酯呈显著负相关($P<0.05$)。*Monascus* 与乳酸乙酯显著负相关($P<0.05$);*Apiotrichum* 与 2-丁醇、异丁醇和异戊醇显著负相关($P<0.05$)。以上结果表明,红谷黄酒发酵过程中微生物多样性有显著性变化,并与其理化指标及风味变化具有一定相关性;本研究为后续红谷黄酒品质的提升与发展提供了理论参考。

关键词:红谷黄酒,高通量测序,菌落结构,风味,理化指标

中图分类号:TS261.1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2022)23-0133-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022020255

本文网刊:



Correlation Analysis between Microbial Diversity and Physicochemical Indexes, Volatile Flavor during the Fermentation of Red Millet Huangjiu

GU Xiaodong¹, LI Suping¹, YANG Liuqing², LIU Yilin², MA Yanli^{1,2,*},
CHEN Zhizhou^{1,3,*}, WANG Yin Zhuang¹, LIU Xu¹

(1.College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China;

2.Zhang Zhongjing School of Chinese Medicine, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China;

3.College of Mechanical and Electrical, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: In order to explore the correlation between physicochemical indexes, volatile flavor and microbial diversity during the fermentation of red millet Huangjiu, high throughput sequencing of microorganisms, physicochemical index detection and gas chromatography-mass spectrometry were used and SPSS software was applied for correlation analysis.

收稿日期: 2022-02-28

基金项目: 国家自然科学基金(31601462); 南阳市科技重大专项(2019ZDZX10); 河南省工业微生物资源与发酵技术重点实验室开放课题(HIMFT20190307、HIMFT20190308); 河南省高等学校青年骨干培养计划(2020GGJS226)。

作者简介: 谷晓东(1996-),男,硕士研究生,研究方向:食品工程,E-mail: 1921261906@qq.com。

* 通信作者: 马艳莉(1982-),女,博士,教授,研究方向:食品营养与安全,E-mail: myl_dz@sina.com。

陈志周(1968-),男,博士,教授,研究方向:食品包装材料与技术,E-mail: chenzhizhou2003@126.com。

The results showed that during the progress of fermentation, the content of reducing sugar decreased rapidly at first and then became stabilized gradually, while the trend of alcohol content was opposite; the content of total acid increased rapidly in the early stage, then decreased and finally increased again, while the pH value stayed at a same level; the alteration of amino acid nitrogen level was volatility risen in the beginning and then increased fast, while soluble solids content first declined quickly and then kept stabilized. A total of 14 bacterial phyla and 228 bacterial genera, 7 fungal phyla and 108 fungal genera were detected in 10 stages (1~7, 10, 20, 30 days) during fermentation. At the genus level, the bacterial community could be clustered in 3 types, and the fungal community could be clustered in 5 types. Bacteria genus levels were positively correlated with total acid ($P<0.05$) while negatively correlated with reducing sugar ($P<0.05$), and fungi genus levels were positively correlated with amino nitrogen ($P<0.05$). 2,3-Butanediol and ethyl lactate were positively correlated with most of the bacteria ($P<0.05$). *Klebsiella* was negatively correlated with ethyl octanoate ($P<0.05$), while *Lactococcus* was negatively correlated with ethanol, 2-butanol, isobutanol, phenylethanol and ethyl palmitate ($P<0.05$). *Monascus* was significantly negatively correlated with ethyl lactate ($P<0.05$), while *Apiotrichum* was negatively correlated with 2-butanol, isobutanol and isoamyl alcohol ($P<0.05$). Our results indicated that the microbial diversity significantly changed during the fermentation of red millet Huangjiu, which had a certain correlation with the physicochemical indicators and flavor variations. These findings provided a theoretical reference for the subsequent study on quality improvement and development of red millet Huangjiu.

Key words: red millet huangjiu; high-throughput sequencing; colony structure; flavor; physicochemical indexes

黄酒是我国传统的发酵酒精饮品之一^[1],其历史悠久,与啤酒、葡萄酒并称为世界三大古酒^[2-3]。因其营养丰富,富含氨基酸、有机酸、多种维生素、活性多肽、功能性低聚糖及微量元素^[4-7],素有“酒中之祖、液体蛋糕”美誉;具有降血压、抗氧化、提高免疫力、降胆固醇和抗衰老等生理功效^[8-10]。黄酒通常是以富含淀粉的糯米、小米、高粱等谷物为原料^[11],曲药作为糖化发酵剂,经过浸米、蒸米、摊凉、落缸、拌曲、发酵、压榨、澄清、过滤、杀菌等多道工序^[12]酿造而成。

具有养生及保健作用的小米黄酒已成为研究热点之一,如石黎琳等^[13]利用顶空固相微萃取技术,结合气相色谱-质谱联用检测技术研究了不同品种小米对黄酒风味的影响。红酒谷(*Panicum miliaceum* L.)是河南省南阳盆地的特色农作物,外壳呈红色,脱壳后得到的小米也称红小米。其性温,是药食两用食材,具有清热止渴、滋阴补肾、健脾暖胃之功效^[14]。其富含多种营养物质、比例协调,常被用于酿造南阳黄酒,使得南阳黄酒具有独特的风味^[15]。南阳更因此入围“世界美酒特色产区^[16]”。极大促进了黄酒生产原料红谷产业的发展,成为当地农民增收的新路径,广泛获得当地政府和扶贫部门认可^[15, 17]。红谷的发展大有前景。

微生物对于发酵过程中风味物质的产生有很大的影响,多样的微生物结构使发酵食品经过复杂的微生物代谢作用产生了多样性的风味变化。洪家丽等^[18]通过红曲黄酒研究发现乳球菌属、酿酒酵母和假单胞菌属等与酿造过程中的挥发性风味物质大多呈正相关。陈蒙恩等^[19]研究陶融型大曲发现芽孢杆菌属和乳杆菌属与吡嗪类、酯类和芳香族类等多数挥发性风味成分呈显著正相关,魏斯氏菌属与吡嗪类、酮类、酸类和酯类均呈显著正相关。严超^[20]经研究发现多种细菌可以与同一风味物质具有相关性,某种微

生物也能够与多种风味物质具有相关性;乳酸杆菌属和乳球菌属等与脂肪酸类以及酯类物质具有很强的相关性;伯克氏菌属与高级醇具有较强的相关性,芽孢杆菌与氨基酸具有较强的相关性,肠杆菌属和乳酸杆菌属等与有机酸具有较强的相关性。食品中风味物质的形成如酸、酯、醇、有机酸等都与微生物的作用相关。

Li 等^[21]通过比较红谷与其他 5 种酿造原料在预处理过程中的理化和结构特性发现红谷含有较高的蛋白质,浸泡后浸泡水酸度高、回生值低和预处理后具有较大的孔状结构,对于进一步的酿造可能有益。红谷具有较高的营养价值且适用于酿造的特点,可作为黄酒新的酿酒原料,目前这一新原料还未被深入开发。本研究以红谷黄酒酒醪为对象,通过高通量测序技术分析不同发酵时间的酒醪中微生物群落结构及其与风味的相关性。旨在更好地了解研究红谷黄酒发酵机理,为红谷黄酒品质的提升与发展提供理论参考。

1 材料方法

1.1 材料与仪器

红谷 河南南阳当地超市;小米红曲 河南南阳润之酒业;甲醛 洛阳市化学试剂厂;氢氧化钠 天津市风船化学试剂科技有限公司;葡萄糖、苯酚 天津市科密欧化学试剂有限公司;3,5-二硝基水杨酸 天津市光复精细化工研究所;酒石酸钾钠、无水亚硫酸钠 天津市光复科技发展有限公司;盐酸 洛阳昊华化学试剂有限公司;以上所用试剂均为分析纯;3-辛醇标准品(纯度 $\geq 98\%$) 上海麦克林试剂有限公司;PowerSoil® DNA Isolation Kit 试剂提取盒 深圳市安必胜科技有限公司;KOD FX Neo 聚合酶(活力 1 U/ μ L)、KOD FX Neo 缓冲液 东洋纺(上海)生物科技有限公司;脱氧核苷三磷酸(dNTP) 上海源叶生物科技有限公司;ddH₂O 上海谱振生物科

技有限公司; OMEGA DNA 纯化柱 广州飞扬生物工程有限公司。

5424R 高速冷冻离心机 上海力申科学仪器有限公司; PAL- α 糖度计 日本爱拓公司; ME204E 电子分析天平 梅特勒-托利仪器(上海)有限公司; PHS-3C pH 计 上海仪电科学仪器股份有限公司; 101 型电热鼓风干燥箱 北京市永光明医疗仪器厂; 725N 紫外可见分光光度计 上海仪电分析仪器有限公司; DZKW-4 电热恒温水浴锅 北京中兴伟业仪器有限公司; ZNCL-BS 磁力搅拌器 上海卓越仪器设备有限公司; 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 顶空固相微萃取纤维头 美国 Supelco 公司; 7890B-5975C 气相色谱-质谱联用仪 美国 Agilent 仪器有限公司; NanoDrop 2000 超微量分光光度计 上海在途生物科技有限公司; Illumina Novaseq6000 PE250 高通量测序平台 北京擎科生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 红谷黄酒的发酵 以红谷为原料(以干米质量 2 倍的纯净水浸泡 24 h), 小米红曲为酒曲, 料液比(干红谷:酒曲:水)为 1:0.16:0.5(g/g)将蒸熟晾凉后的红谷、酒曲、水混合均匀, 落料品温控制在 24~28 $^{\circ}\text{C}$; 前发酵维持 7 d, 发酵温度为 28~32 $^{\circ}\text{C}$; 后发酵时间为 23 d, 控制温度 25~26 $^{\circ}\text{C}$, 酿造红谷黄酒并于发酵过程中取样 10 次, 分别为第 1~7、10、20 和 30 d, 每个样品做三个平行。

1.2.2 理化指标测定 样品先 7500 r/min 离心 10 min, 取上清液测定。

1.2.2.1 总糖、还原糖的测定 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定^[22]。

a. 葡萄糖标准液配制: 称取大于 1 g 的葡萄糖置于热风干燥箱 98 $^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重, 准确称取 1.000 g 葡萄糖, 用蒸馏水溶解并定容至 1000 mL。分别取 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于 25 mL 具塞试管中补蒸馏水至 1.5 mL, 加入 1.5 mL DNS 试剂充分混匀后沸水浴 5 min, 流水冷却后定容至 25 mL 混匀, 放置 20 min 后以蒸馏水为空白对照在 540 nm 波长下测定吸光度, 绘制吸光度-葡萄糖浓度曲线的回归方程。回归方程为: $y=0.4811x-0.0295(R^2=0.9979)$ 。

b. 酒样检测: 吸取试样 2~10 mL(控制水解液总糖含量为 1~2 g/L)于 500 mL 容量瓶中, 加水 50 mL 和盐酸溶液(6 mol/L)5 mL, 在 68~70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 15 min。冷却后加入甲基红指示液 2 滴, 用氢氧化钠溶液中和至红色消失(近似于中性)。加水定容, 摇匀, 用滤纸过滤后备用; 测定时, 以试样水解液代替葡萄糖标准溶液, 以蒸馏水为空白对照在 540 nm 波长下测定吸光度代入回归方程得总糖含量。

1.2.2.2 其他理化指标的测定 酒精度、总酸、pH、氨基态氮: 按照 GB/T 13662-2018《黄酒》测定。可溶性固形物: 糖度计测定。

1.2.3 挥发性风味物质的测定 样品前处理: 使用

SPME 设备和 50/30 μm (DVB/CAR/PDMS)涂覆的纤维。将 NaCl(1.0 g)和 25.0 μL 3-辛醇添加到 20 mL 顶空瓶中的样品(7.5 mL)中。将样品在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下萃取 15 min; 然后, 将纤维插入 GC(250 $^{\circ}\text{C}$)的进样口中 7 min 以解吸分析物。用于气相色谱-质谱(Gas Chromatography-Mass Spectrometer, GC-MS)测定^[23]。

GC 的柱温箱温度最初以 50 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min, 以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 至 80 $^{\circ}\text{C}$ (保持 2 min), 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 至 230 $^{\circ}\text{C}$ (保持 10 min), 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 至 250 $^{\circ}\text{C}$ (保持 5 min)。载气: 氦气(>99.999%), 流速为 1 mL/min, 分流比 5:1。

MS 条件: 在 70 eV 电压下产生了在电子碰撞(EI)模式下运行的质量检测器, 离子源温度为 230 $^{\circ}\text{C}$ 。使用全扫描(Scan); 扫描范围 29~350 amu。通过比较质谱库搜索(NIST 14.0 和 Wiley 6.0)和真实标准的保留时间来量化挥发性化合物。对匹配度 80% 以上的组分进行半定量分析, 并将浓度表示为插入内标物(3-辛醇)的当量。

1.2.4 DNA 的提取和 PCR 扩增 采用 PowerSoil® DNA Isolation Kit 试剂盒提取酒醪微生物宏基因组总 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取结果, 用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测 DNA 提取浓度和纯度。以提取的 DNA 为模板, 根据引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对细菌 16S rDNA 的 V3-V4 区扩增。根据引物 ITS1F (5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3')和 ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')对真菌 ITS1 区域的扩增。

DNA 模板 50 ng, 正反向引物各 0.9 μL , KOD FX Neo 聚合酶 0.6 μL , KOD FX Neo 缓冲液 15 μL , 脱氧核苷三磷酸(dNTP) 6 μL , 加入 ddH₂O 定容至 30 μL 。PCR 扩增程序: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存^[24]。

1.2.5 高通量测序 PCR 产物通过 1.8% 琼脂糖凝胶回收, 利用 OMEGA DNA 纯化柱进行纯化, 用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 文库构建和测序由北京擎科生物科技有限公司 Illumina Novaseq6000 PE250 平台来完成。以上 DNA 的提取、PCR 扩增及高通量测序均由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.3 数据处理

实验数据使用 Origin Pro 8.6 统计程序分析, 显著性分析使用 SPSS v.22.0 软件。将 Illumina Novaseq 6000 PE250 测序平台生成的原始数据使用 QIIME 平台进行生物学信息分析, 具体如下: 测序得到的数据首先将成对的 reads 拼成一条序列, 使用 Usearch v10 软件对拼接效果进行质量控制和过滤; 然后使用 cutadapt 1.9.1 软件根据引物序列和序列首末两端的条形码(barcode)进行区分样品; 使用 UCHIME v4.2 软件, 鉴定并去除嵌合体序列并得到有效序列;

使用 Usearch 软件对前述得到的优化序列按 97% 的相似度进行操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs) 划分。以 SILVA 和 NCBI 为参考数据库, 利用 QIIME 软件生成不同分类水平上的物种丰度表以及使用 MEGAN 软件将测序得到的物种丰度信息回归至数据库的分类学系统关系树中。使用 QIIME 平台自带程序分别计算黄酒样品真菌和细菌的 α 与 β 多样性 (β 多样性采用 binary jaccard、bray curtis、weighted unifracc (限细菌)、unweighted unifracc (限细菌) 等 4 种算法计算)。微生物检测所得数据的处理计算均由北京擎科生物科技有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 发酵过程中理化指标变化

经检测红谷黄酒最终总糖含量为 9.18 g/L, 根据 GB/T 13662-2018《黄酒》标准, 为非稻米干型黄酒。由表 1 可知, 还原糖含量先急剧减少后逐渐稳定。发酵 1 d 酒中还原糖含量较高可能是因为酒曲中存在的 α -淀粉酶和 γ -淀粉酶共同作用于淀粉, 将原料内的淀粉分解后产生大量还原糖。发酵 1~7 d, 从 49.37 g/L 降低至 12.36 g/L, 可能由于发酵剂分泌的淀粉酶附着于谷物原料, 将淀粉等生物大分子分解成的糖类转化成谷氨酸、乙醇等小分子物质, 用于后期风味形成^[25]。发酵后期含量变化较平缓在 5.93 g/L 左右, 酒醪中只存在少量葡萄糖、糊精、低聚糖。

酒精度变化趋势与还原糖相反, 前酵 (1~7 d) 酒精度从 1.30%vol 快速上升至 14.73%vol。后酵 (第 8~30 d) 发酵温度降低, 酒精度增长缓慢; 20 d 达到最高值 (15.55%vol), 30 d 酒精度有所下降 (14.63%vol)。后酵阶段酒精度较高可能会反过来抑制酵母菌的代谢活动, 导致还原糖的分解转化效率降低, 导致黄酒糖分积累; 乙醇也可与酸类物质进行酯化反应生成酯类成分^[26]。

总酸含量先快速增加 (1~4 d) 后减少 (5~7 d) 再增加 (10~30 d)。发酵初始酒中总酸含量为 3.54 g/L, 可能是前期谷物浸泡的米浆水中酸类物质通过蒸米饭带入发酵醪中, 从而创造适合发酵醪中酵母菌生长的发酵环境, 抑制杂菌的生长^[27]。发酵后期总酸增

加, 可能是产酸菌株在后期酿造中也比较活跃^[28]。红谷在发酵过程中易吸水溶胀, 使自溶产物增加 (氨基酸、有机酸), 而有机酸作为乳酸菌代谢主要产物, 发酵醪酸值与乳酸杆菌数量成正相关^[29]。pH 在发酵过程中未见显著变化 ($P>0.05$), 发酵结束时 pH<4 (3.66)。较低的 pH 为有益优势菌群的快速繁殖、生长提供适宜的环境, 保证发酵顺利完成^[30]。

氨基态氮先波动增加 (0~7 d) 后急剧上升 (10~30 d)。由于前酵时间较短, 酒中蛋白质初级水解, 氨基态氮生成量少, 稳定在 0.26~0.59 g/L。发酵后期原料中蛋白质在酒曲微生物分泌的肽酶、蛋白酶作用下逐步水解成氨基酸等营养物质, 从而导致氨基态氮富集^[31]。除了原料 (米和酒曲) 中蛋白质能释放氨基态氮, 酵母酿造后期自溶也会增加氨基态氮含量^[31]。

可溶性固形物先剧烈下降 (1~3 d) 后趋于稳定 (4~30 d)。发酵 1 d 样品可溶性固形物大部分来自于酒曲中曲霉、根霉等微生物代谢产物。可溶性固形物含量随时间增加而迅速降低, 在 4 d 降至最低 10.36%。这是因为糖类等营养物质被酒曲中的微生物大量消耗转化为乙醇、二氧化碳等非可溶性固形物, 可溶性固形物含量呈下降趋势^[32]。随着发酵的进行固形物含量增加, 发酵 30 d 含量略有回升为 12.25%, 可能是发酵后期微量元素、水溶性蛋白等有机物的积累所致。

2.2 发酵过程中挥发性风味物质变化

由表 2 可知, 发酵阶段检测出 7 种醇、9 种酯、2 种酸和 1 种醛共 19 种挥发性风味物质。这些物质在酒中的含量不同形成了黄酒不同的香气特征^[33]。醛类、酮类、酯类、醇类等非烃类化合物是黄酒香气的主要来源^[34]。由表 2 可知, 黄酒中醇和酯类含量较多, 种类丰富, 发酵结束时含量分别为 687718.51 $\mu\text{g/L}$ 和 70684.11 $\mu\text{g/L}$, 乙醇是黄酒中主要的成分。苯乙醇具有玫瑰香、甜香香气, 可以贡献愉悦、柔和、协调的黄酒香气^[35], 其含量在第 30 d 为 768.82 $\mu\text{g/L}$ 。2-丁醇、异丁醇、异戊醇和 2,3-丁二醇是黄酒中的重要醇。醇类物质由谷物蛋白分解得到的氨基酸分解代谢形成, 是陈化酯类成分的前体物质。

表 1 发酵过程中红谷黄酒理化指标

Table 1 Physiochemical indexes of red millet Huangjiu during fermentation

取样时间(d)	总糖(g/L)	还原糖(g/L)	酒精度(%vol)	总酸(g/L)	pH	氨基态氮(g/L)	可溶性固形物(%)
1	—	49.37±0.35 ^a	1.30±0.07 ^j	3.54±0.06 ^e	3.79±0.01 ^a	0.28±0.01 ^b	22.02±0.03 ^a
2	—	27.59±0.29 ^b	3.73±0.06 ⁱ	5.69±0.07 ^f	3.73±0.01 ^a	0.26±0.01 ^b	15.54±0.05 ^b
3	—	21.53±0.14 ^c	9.28±0.11 ^h	6.84±0.11 ^e	3.68±0.01 ^a	0.50±0.03 ^f	10.63±0.12 ^b
4	—	17.78±0.35 ^d	10.98±0.02 ^g	7.61±0.09 ^b	3.67±0.01 ^a	0.59±0.03 ^d	10.36±0.02 ^j
5	—	15.26±0.06 ^e	11.81±0.03 ^f	7.22±0.10 ^{cd}	3.66±0.01 ^a	0.50±0.04 ^f	10.59±0.03 ⁱ
6	—	12.50±0.27 ^f	12.06±0.06 ^e	7.18±0.12 ^d	3.73±0.01 ^a	0.52±0.01 ^e	11.03±0.05 ^f
7	—	12.36±0.32 ^e	14.73±0.03 ^c	7.22±0.06 ^{cd}	3.70±0.01 ^a	0.59±0.02 ^d	11.14±0.08 ^e
10	—	9.48±0.06 ^h	15.23±0.02 ^b	7.37±0.07 ^c	3.70±0.01 ^a	0.67±0.03 ^c	10.78±0.04 ^g
20	—	6.32±0.09 ⁱ	15.55±0.06 ^a	7.56±0.08 ^b	3.69±0.01 ^a	0.79±0.03 ^b	11.18±0.06 ^d
30	9.18±0.01	5.93±0.07 ^j	14.63±0.04 ^d	7.80±0.06 ^a	3.66±0.01 ^a	1.06±0.04 ^a	12.25±0.13 ^c

注:同一列中的不同字母根据Duncan测验($P<0.05$)有显著差异。

表 2 红谷黄酒发酵过程中的挥发性风味物质含量

Table 2 Contents of volatile flavor compounds in the fermentation process of red millet Huangjiu

序号	含量(μg/L)	样品									
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	10 d	20 d	30 d
1	乙醇	52134.42±3377.21 ^e	149915.88±7825.52 ^d	373055.94±2731.25 ^c	440994.14±33771.12 ^b	474572.74±35896.78 ^b	484599.04±36217.20 ^b	592017.14±43982.99 ^a	611814.41±4623.47 ^a	624836.10±46122.93 ^a	587669.00±40266.84 ^a
2	2-丁醇	1136.16±112.90 ^f	2710.44±169.74 ^e	4769.59±217.92 ^d	5723.59±179.32 ^c	6101.27±432.55 ^{bc}	6564.99±462.11 ^b	6590.94±453.20 ^b	7687.23±538.84 ^a	7409.12±501.22 ^a	6598.43±482.97 ^b
3	异丁醇	282.92±14.16 ^e	3726.78±45.21 ^d	10284.37±714.25 ^c	11835.58±861.27 ^{abc}	11969.42±877.99 ^{abc}	12525.91±2128.44 ^{ab}	12699.31±924.20 ^{ab}	13491.10±823.47 ^a	12715.77±1045.13 ^{ab}	11000.01±556.07 ^{bc}
4	异戊醇	627.21±43.97 ^d	9394.46±598.51 ^c	26445.11±1802.96 ^b	29888.60±1945.33 ^a	30393.38±2001.87 ^a	31323.60±2511.32 ^a	32188.63±2311.46 ^a	32652.64±2395.74 ^a	30159.71±2022.47 ^a	25630.71±1731.82 ^b
5	2,3-丁二醇	2795.11±155.29 ^{cd}	5589.75±472.46 ^b	nd	2367.33±152.07 ^d	nd	2747.25±161.26 ^{cd}	nd	nd	3009.86±195.45 ^c	11008.34±812.49 ^a
6	苯乙醇	nd	210.12±15.20 ^e	618.44±44.75 ^d	749.98±51.32 ^c	896.08±60.83 ^b	766.61±52.77 ^c	1149.51±84.58 ^a	790.86±61.74 ^c	826.64±63.99 ^{bc}	768.82±51.66 ^c
7	(2R,3R)-(-)-2,3-丁二醇	nd	nd	14682.21±1221.45 ^b	11245.10±954.79 ^c	13002.01±1106.94 ^{bc}	12778.78±942.32 ^{bc}	33132.36±2236.14 ^a	2329.19±156.89 ^d	12859.08±912.15 ^{bc}	1128.39±12.96 ^d
8	乙酸乙酯	390.71±21.25 ^e	5053.39±402.14 ^d	22166.20±1499.96 ^c	31087.09±1976.23 ^b	34667.14±2120.59 ^b	32015.80±2249.78 ^b	nd	nd	nd	52828.30±4135.98 ^a
9	正己酸乙酯	68.99±3.99 ^f	346.10±20.11 ^e	726.95±32.54 ^c	816.86±55.96 ^{bc}	808.27±43.52 ^{bc}	859.83±51.23 ^b	585.72±47.93 ^d	997.91±109.26 ^a	574.87±61.99 ^d	983.36±71.84 ^a
10	辛酸乙酯	30.48±2.48 ^g	178.43±9.56 ^f	443.65±34.08 ^{cd}	505.77±39.58 ^c	471.51±32.47 ^{cd}	460.13±31.51 ^{cd}	414.02±29.88 ^{de}	786.76±56.29 ^b	369.50±25.33 ^c	947.07±65.37 ^a
11	癸酸乙酯	nd	73.11±8.16 ^b	183.41±20.48 ^b	214.19±13.94 ^b	213.28±17.89 ^b	191.51±23.47 ^b	203.71±14.75 ^b	9390.10±772.18 ^a	164.66±12.43 ^b	216.88±11.76 ^b
12	丁酸乙酯	nd	2742.13±161.57 ^c	nd	nd	7769.50±522.79 ^b	8816.40±625.15 ^{ab}	7893.18±586.34 ^b	9570.82±756.13 ^a	nd	nd
13	乙酸异戊酯	nd	160.67±11.76 ^f	682.85±52.66 ^d	870.78±64.95 ^{bc}	935.24±65.19 ^{ab}	1021.41±41.05 ^a	818.81±60.92 ^c	955.75±82.14 ^{ab}	605.41±44.68 ^d	356.37±27.17 ^e
14	棕榈酸乙酯	nd	nd	1931.92±141.78 ^{ef}	2858.62±189.47 ^{bc}	2263.65±159.74 ^{de}	1733.76±164.01 ^f	2555.16±170.94 ^{cd}	5310.44±414.03 ^a	3220.08±244.88 ^b	3020.13±181.45 ^b
15	乳酸乙酯	nd	nd	nd	nd	835.87±55.21 ^d	nd	1420.52±109.65 ^c	1398.43±111.99 ^c	2344.32±171.20 ^b	6522.39±461.68 ^a
16	亚油酸乙酯	nd	nd	nd	nd	900.37±72.50 ^{cd}	1037.08±54.39 ^b	981.03±79.99 ^{bc}	878.05±66.20 ^{cd}	1264.71±87.04 ^a	801.17±53.19 ^d
17	乙酸	146.03±10.42 ^f	1787.13±83.11 ^e	3974.75±122.89 ^d	4153.82±311.55 ^d	5194.03±371.54 ^c	4431.39±323.98 ^d	7915.91±581.46 ^a	5627.81±438.85 ^{bc}	5407.60±415.57 ^{bc}	5869.98±318.94 ^b
18	丁酸	nd	118.36±10.35 ^c	174.74±30.21 ^b	170.91±12.87 ^b	nd	nd	268.02±17.69 ^a	270.49±18.25 ^a	161.97±9.24 ^b	nd
19	乙醛	1364.63±154.58 ^e	2397.31±157.69 ^c	7289.98±500.00 ^d	7461.452±460.00 ^d	7770.20±522.22 ^d	9250.33±601.12 ^c	11057.09±1001.12 ^b	16458.75±1200.05 ^a	16669.98±1320.56 ^a	6572.29±443.21 ^d

注: nd表示没有检测到;同一行中的不同字母根据Duncan测验($P<0.05$)有显著差异。

酯类的花香、水果香气对黄酒的风味有很大的影响。其中,乙酸乙酯含量最高,从 390.71 μg/L(发酵 1 d)增长到 52828.30 μg/L(发酵 30 d)。酯类物质在后酵后期(20~30 d)快速积累,说明后发酵阶段是一些酯类(乳酸乙酯、己酸乙酯)形成的关键时期,酯类风味可以通过氨基酸、有机酸及其他物质的转化产生。发酵 30 d 的黄酒样品中的乙醛含量较高为 6572.29 μg/L,在发酵前期呈波动上升趋势,后酵期间显著下降($P<0.05$)。这说明在发酵后期乙醛在酒醪微生物的作用下存在一定降解。

研究发现,谷物发酵能增加黄酒中的的非烃类挥发性化合物,如酸类化合物^[31]。酸类物质特别是有机酸(如琥珀酸、乳酸等)对黄酒良好风味的形成具有重要影响^[26]。红谷黄酒产生了大量的乙酸,其是最重要的挥发性酸,占黄酒总酸的 20% 以上。醇、酯、酸、醛等风味物质的相互融合,赋予了红谷黄酒丰

满、醇香、协调的感官品质。

2.3 发酵过程中 Alpha 多样性分析

如表 3 所示,10 次取样中细菌和真菌不重复的 OTU 总个数分别为 438 和 246。在 97% 相似度情况下,细菌 ACE 指数为 252.34~372.68, Shannon 指数为 1.65~4.72, Chao 1 指数为 234.03~395.22, 覆盖率 99.90%~99.94%。发酵 5 d 和 20 d 细菌 Chao 1 指数和 ACE 指数数值较高,表明发酵 5 d 和 20 d 细菌群落丰富度较高,群落结构较为复杂。发酵 4 d 的 Shannon 指数最高,随后逐渐降低,可能是发酵过程中低氧、高酸及高乙醇等因素导致许多细菌生长受抑制。

发酵过程中真菌 ACE 指数为 96.59~220.62, Shannon 指数为 1.28~3.69, Chao 1 指数为 89.50~176.00, 覆盖率 99.97%~99.99%。发酵 30 d 的 Shannon 指数最大,表明发酵结束时酒糟微生物多样性远高于发酵

表 3 发酵过程中细菌和真菌多样性指数表

Table 3 Table of bacteria and fungi diversity indexes during fermentation

取样时间(d)	序列数		OTU数		Shannon指数		ACE指数		Chao 1指数		覆盖率(%)	
	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌	细菌	真菌
1	79366	79394	180	98	1.65	1.65	252.34	164.75	234.03	132.00	99.92	99.98
2	79687	78917	282	80	3.07	1.28	316.16	96.59	323.78	99.43	99.94	99.98
3	79363	79016	182	82	2.06	1.50	320.19	97.55	273.29	89.50	99.91	99.99
4	79431	78854	306	76	4.72	1.31	348.57	123.28	363.42	94.20	99.90	99.98
5	79393	78917	333	81	4.55	1.38	372.68	102.29	395.22	92.00	99.90	99.99
6	79496	79363	257	88	2.54	1.35	319.24	113.88	317.61	97.43	99.91	99.98
7	79458	79037	225	88	2.33	1.53	284.51	123.51	275.73	101.60	99.91	99.98
10	79498	79231	300	85	4.35	1.30	331.40	104.22	328.75	92.86	99.94	99.99
20	80053	78769	341	107	3.74	1.96	369.03	185.14	384.13	149.00	99.94	99.97
30	79533	79367	280	146	2.44	3.69	318.96	220.62	321.62	176.00	99.93	99.98
不重复的OTU总个数			438	246								

期。实验样品中细菌和真菌文库覆盖率都较高,表明本次测序结果基本能够代表样品实际情况。

2.4 发酵过程中菌落结构变化

2.4.1 细菌结构 在门水平 10 次取样共检测出 14 个细菌门,主要细菌门(平均含量大于 1%)有变形杆菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)(图 1a)。

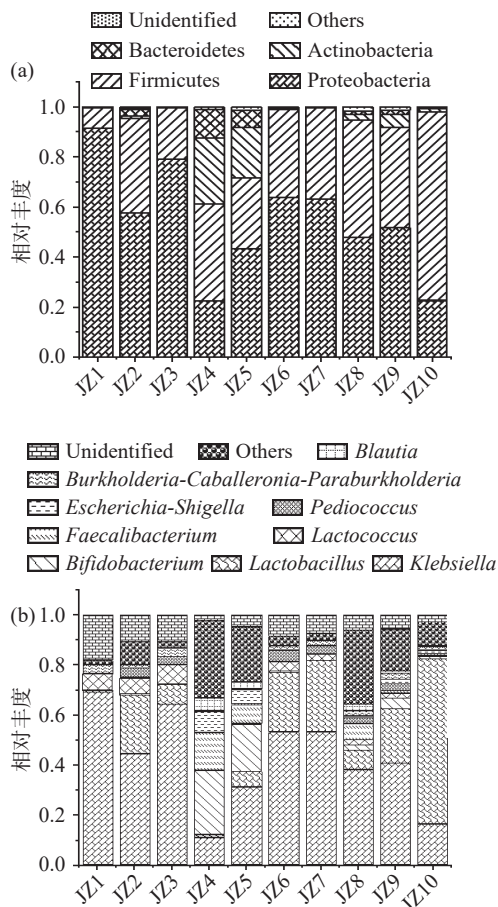


图 1 发酵过程中主要细菌门和主要细菌属分布

Fig.1 Changes in relative abundance of major bacterial phylum and major bacterial genus during fermentation

注: a: 门, b: 属, 图 3 同; JZ1~JZ7、JZ8、JZ9、JZ10 分别表示发酵 1~7、10、20、30 d 取样, 图 2~图 4 同。

10 次取样中均有分布且相对丰度较高的为 Proteobacteria 和 Firmicutes。变形菌门是细菌中最大一门,包括很多病原菌,如大肠杆菌、沙门氏菌等著名的种类^[36],生长可能会受到发酵过程中低氧、高酸及高乙醇等因素抑制。

在属水平 10 次取样共检测出 228 个细菌属,主要菌属(平均含量大于 0.1%)有克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、粪杆菌属(*Faecalibacterium*)、片球菌属(*Pediococcus*)、大肠埃氏菌属-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*、布劳特氏菌属(*Blautia*)(图 1b)。发酵过程中主要优势菌属为 *Klebsiella*、*Lactobacillus*、*Lactococcus* 和 *Pediococcus*。随着发酵进行 *Lactobacillus* 相对丰度逐渐增加并在发酵末期成为绝对优势菌属,这与韩国米酒中发现乳杆菌属细菌在米酒发酵阶段逐渐成为优势菌结果一致^[37]。乳杆菌属、片球菌属、乳球菌属都是乳酸菌,乳酸菌在酿造过程中能利用发酵糖类产生乳酸等降低酒中 pH,并且乳酸与乙醇反应生成酯类是酒中重要风味物质,同时乳酸菌代谢产生乙酰和双乙酰赋予酒特色风味^[38]。肠杆菌属一般为非条件致病菌或条件致病菌,部分肠杆菌属是为人体肠道内正常微生物,能够利用糖酵解和戊糖磷酸途径对糖进行降解产生有机酸^[37]。芽孢杆菌的 α -淀粉酶活性和糖化酶活性很高^[37, 39],有利于黄酒主发酵的糖化,但红谷黄酒中未发现芽孢杆菌,这可能是酒曲原料及酿造工艺的不同,导致酒曲微生物组成也不同。

2.4.2 细菌属群落结构相似性 由 NMDS 图(图 2a)可知,发酵 3、7 d 的细菌属群落同在第三象限;发酵 2、4、5、6、10、20、30 d 的细菌属群落较近,都靠近横轴差异较小;发酵 1 d 细菌属远离其他发酵时间的,差异较大为单独群组。如图 2b, 10 次取样细菌属群落可分为 3 类,发酵 3、7 d 的细菌属群落可聚为一类,发酵 2、4、5、6、10、20、30 d 的细菌属群落聚为一类,发酵 1 d 细菌属单独为一类。NMDS 图分析结果和 Beta 分析较为相似。

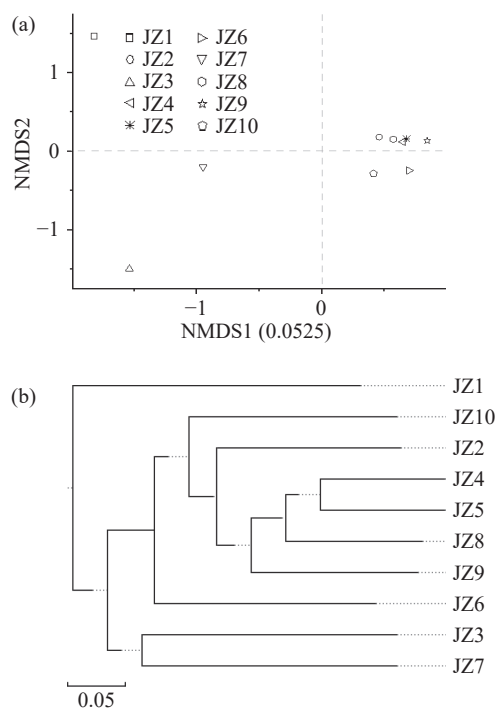


图 2 细菌属群落结构相似性分析

Fig.2 Community structure similarity analysis of bacterial genera

注: a: 非度量多维尺度分析图, b: 基于 Beta 多样性距离的样品层级聚类树; 图 4 同。

2.4.3 真菌结构 在门水平上 10 次取样共检测出 7 个真菌门, 主要(平均含量大于 1%)为子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)(图 3a)。在整个发酵过程中 Ascomycota 是绝对优势菌门, 说明其在发酵过程中起主要作用。有研究表明子囊菌门不仅是黄酒发酵过程中优势真菌, 也是白酒及食醋等多种发酵食品中主要真菌群落^[40]。子囊菌中有些著名真菌(酿酒酵母等)是烘焙和酿造工业的基础菌株^[41]。

在属水平上 10 次取样共检测出 108 个真菌属, 主要的真菌属(平均含量大于 0.1%)有红曲霉属(*Monascus*)、酵母属(*Saccharomyces*)、塞伯林德纳氏酵母属(*Cyberlindnera*)、*Apiotrichum*、米勒氏酵母属(*Millerozyma*)、*Saitozyma*、镰刀菌属(*Fusarium*)、链格孢属(*Alternaria*)、被孢霉属(*Mortierella*)、分子孢子菌属(*Cladosporium*)(图 3b)。不同发酵时期真菌群落组成相似但丰度存在较大差异。*Monascus*、*Saccharomyces* 在发酵过程中是优势真菌属。酵母菌属是一种重要真菌有较强发酵、高产乙醇能力, 乙醇耐受性强, 能发酵葡萄糖、麦芽糖等产生酒精, 在酿酒工业中有着重要应用^[42], 是白酒酿造过程中最主要的功能菌株^[43]。

2.4.4 真菌属群落结构相似性 由主成分分析(图 4a)可知, 发酵 2、3、7 d 的真菌属群落距离较近, 差异性较小; 发酵 4、5、6、10 d 的真菌属群落距离较近, 差异性较小; 发酵 1、20、30 d 的真菌属群落均离其他

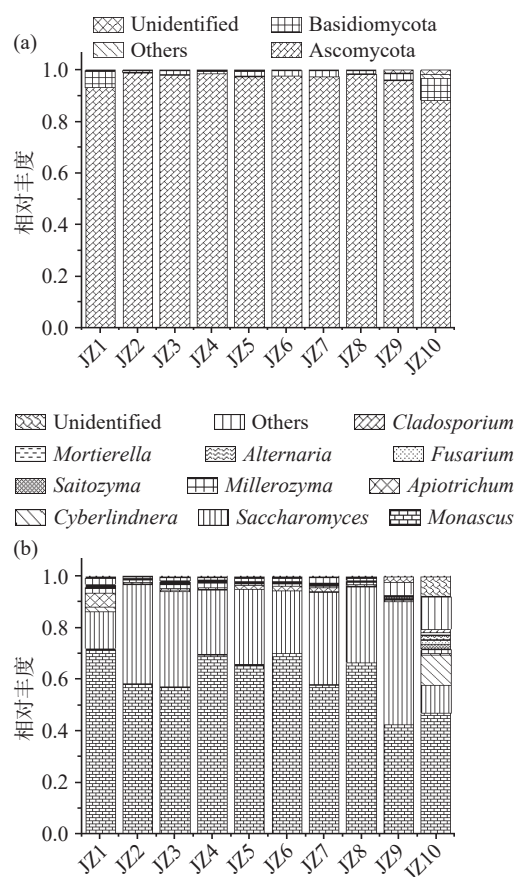


图 3 发酵过程中主要真菌门和主要真菌属的分布

Fig.3 Changes in relative abundance of major fungi phylum and major fungi genus during fermentation

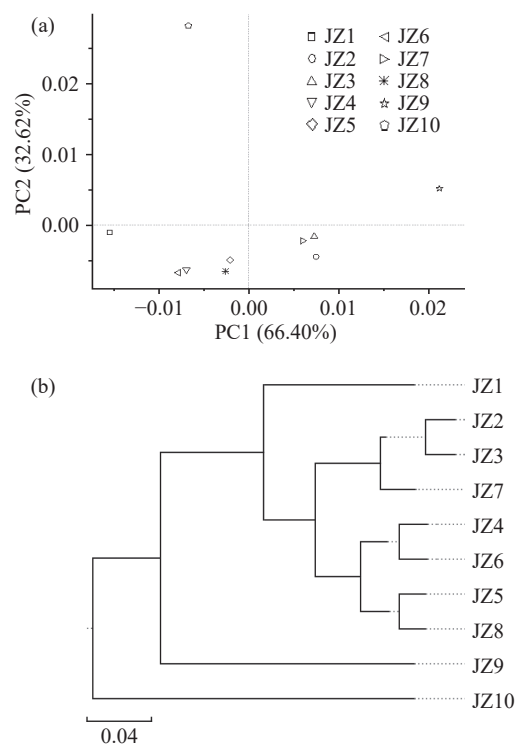


图 4 真菌属群落结构相似性分析

Fig.4 Community structure similarity analysis of fungi genera

菌落较远, 差异较大为单独组群。由 NMDS 图分析(图 4b)可知, 10 次取样真菌群落聚类分析后可分为

5 个类群, 发酵 2、3、7 d 的真菌属聚为一类, 发酵 4、5、6、10 d 的真菌属聚为一类, 发酵 1、20、30 d 的真菌属分别单独为一类。Beta 分析结果与 PCA 分析较为相似。

2.5 发酵过程中微生物群落与代谢产物相关性

2.5.1 理化指标与微生物群落相关性分析 利用 SPSS 软件对红谷黄酒发酵过程中理化指标与微生物多样性进行 Pearson 相关性分析。如表 4 所示, 细菌多样性与还原糖呈显著负相关, 相关系数为 $-0.664 (P<0.05)$; 与总酸呈显著正相关, 相关系数为 $0.644 (P<0.05)$; 氨基态氮与真菌多样性呈显著正相关, 相关系数为 $0.643 (P<0.05)$ 。

表 4 发酵过程中理化指标与微生物多样性的相关性
Table 4 Correlation coefficients between physicochemical indicators and microbial diversity during fermentation

指标	酒精度	还原糖	总酸	pH	可溶性固形物	氨基态氮
细菌	0.558	-0.664^*	0.644^*	-0.600	-0.536	0.499
真菌	0.191	-0.124	0.022	-0.035	0.219	0.643^*

注: *表示显著相关($P<0.05$)。

2.5.2 微生物群落与挥发性物质相关性 图 5 显示微生物与挥发性化合物相关性。3 个细菌属与挥发性化合物显著相关($P<0.05$)。Klebsiella 与辛酸乙酯显著负相关($P<0.05$); Lactobacillus 与 2,3-丁二醇、

乳酸乙酯极显著正相关($P<0.01$); Lactococcus 与乙醇、2-丁醇、异丁醇、苯乙醇和棕榈酸乙酯呈显著负相关($P<0.05$)。有研究表明 Lactobacillus 是酱香型白酒窖内发酵过程中最常见重要微生物菌群^[44]。Lactobacillus 在谷物当中普遍存在, 能将葡萄糖转化为乳酸, 为酵母形成乳酸乙酯提供底物, 而乳酸乙酯是白酒中重要的风味成分之一^[45]。Lactobacillus 和 Klebsiella 与醋酸呈现较强的相关性^[46]。

9 个真菌属与挥发性化合物显著相关($P<0.05$)。Monascus 与乳酸乙酯显著负相关($P<0.05$); Cyberlindnera 与 2,3-丁二醇和乳酸乙酯极显著正相关($P<0.01$); Apiotrichum 与 2-丁醇、异丁醇和异戊醇显著负相关($P<0.05$); Millerozyma 与亚油酸乙酯和乙醛显著负相关($P<0.05$); Saitozyma、Fusarium、Alternaria、Mortierella 和 Cladosporium 与 2,3-丁二醇以及乳酸乙酯显著正相关($P<0.05$); Fusarium 与乙酸乙酯和辛酸乙酯显著正相关($P<0.05$); 洪家丽等^[18]研究发现米曲霉和紫色红曲霉等真菌与发酵过程中的大部分挥发性风味物质呈负相关, 这与本研究类似。酵母菌属在发酵过程中对风味物质的影响较大, 与乳酸乙酯和亚油酸乙酯呈正相关^[47], 而本文结果中酵母菌属与乳酸乙酯负相关, 与亚油酸乙酯呈正相关, 但结果并不显著($P>0.05$)。链格孢属与酸类物质有较强的相关性, 与风味的形成关系密切^[48], 在空气中大量存

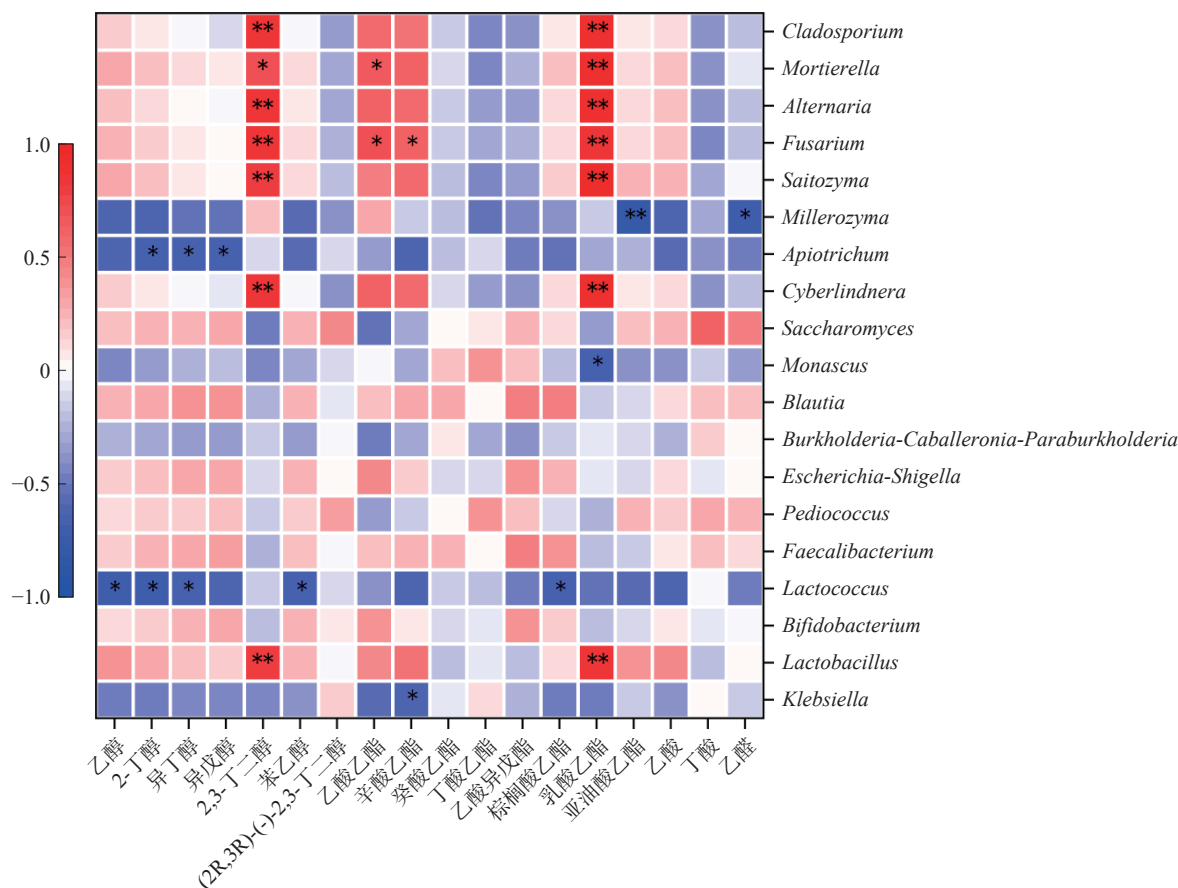


图 5 红谷黄酒发酵过程中微生物群落与挥发性物质相关性热图

Fig.5 Heatmap of correlation between microbial community and volatile substances during fermentation of red millet Huangjiu

在,能够在粮食中快速生长但不利于大曲发酵和白酒酿造^[49]。链格孢属与异丁醇有极强的相关性^[46],在本研究中链格孢属与异丁醇呈正相关,但结果并不显著($P>0.05$)。

3 结论

本研究利用高通量测序技术分析红谷黄酒不同发酵时期样品中微生物群落及其多样性。结果显示红谷黄酒不同发酵时期共检测出 14 个细菌门和 228 个细菌属;7 个真菌门和 108 个细菌属。不同时期菌落结构相似但丰度却有较大差异,体现了红谷黄酒发酵过程微生物组成种类的复杂程度。

对红谷黄酒发酵过程中理化指标及风味与微生物多样性进行 Pearson 相关性分析显示,发酵过程中细菌属水平与总酸正相关,与还原糖负相关,真菌属水平与氨基态氮正相关。3 个细菌属、9 个真菌属与挥发性化合物显著相关($P<0.05$)。乳酸杆菌属在发酵过程中逐渐成为优势菌属,为酒中重要风味乳酸乙酯的形成提供底物。酵母菌属在发酵过程中对风味物质的影响较大,与多种酯类物质的形成有相关性。这些对酒风味物质的改善有重要的意义。

酒的品质、风味受微生物代谢产物影响很大,本研究通过对红谷黄酒发酵过程中微生物群落结构及与风味相关性进行分析,为后续红谷黄酒品质提升与发展提供理论参考。但是同时也有一些可能对人体健康构成潜在威胁的物质被检出,例如致病菌克雷伯氏菌属,这说明黄酒在酿造过程中尤其是主发酵阶段容易受原料、环境和病原微生物的影响,在今后酿造黄酒的过程中应如何避免这类物质的污染还有待研究,或许可以从原料的灭菌、通气的方式以及发酵环境等方面入手。

参考文献

- [1] YANG Y J, XIA Y J, WANG G Q, et al. Effect of mixed yeast starter on volatile flavor compounds in Chinese rice wine during different brewing stages[J]. *LWT*, 2017, 78: 373–381.
- [2] 汪江波,王浩,孔博,等.黄酒酿造技术研究进展[J].*酿酒*, 2020, 47(6): 26–30. [WANG Jiangbo, WANG Hao, KONG Bo, et al. Recent advances in Huangjiu fermentation technology[J]. *Liquor Making*, 2020, 47(6): 26–30.]
- [3] 韩惠敏.黑米黄酒的酿造关键技术及体外抗氧化活性研究[D].汉中:陕西理工大学,2020. [HAN Huimin. Research on the key brewing process and antioxidant activity of black rice Huangjiu *in-vitro*[D]. Hanzhong: Shaanxi University of Technology, 2020.]
- [4] 郭睿,杨玲,郭旭凯,等.糯高粱黄酒糖化工艺优化及抗氧化活性分析[J].*中国酿造*, 2018, 37(3): 101–106. [GUO Rui, YANG Ling, GUO Xukai, et al. Optimization of saccharification process of Chinese glutinous sorghum wine and its antioxidant activity analysis[J]. *China Brewing*, 2018, 37(3): 101–106.]
- [5] 胡武瑶,杨映津,窦慧,等.不同麦曲酿造黄酒中挥发性风味物质的代谢差异[J].*食品与发酵工业*, 2020, 46(8): 226–233. [HU Wuyao, YANG Yijin, DOU Hui, et al. Metabolic differences of volatile flavor compounds in Huangjiu fermented with different wheat Qu[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(8): 226–233.]
- [6] 李安,刘小雨,张惟广.小米黄酒酿造工艺的研制及优化[J].*食品研究与开发*, 2020, 41(5): 150–157. [LI An, LIU Xiaoyu, ZHANG Weiguang. Development and optimization of brewing technique of millet wine[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(5): 150–157.]
- [7] 赖敏辉,姬中伟,蒋飞,等.黄芪黍米黄酒酿造工艺研究[J].*食品科技*, 2020, 45(3): 93–99. [LAI Minhui, JI Zhongwei, JIANG Fei, et al. Study on brewing technology of yellow wine with *Astragalus membranaceus* and millet[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(3): 93–99.]
- [8] 周建弟,张蕾,钱斌,等.功能性黄酒提高机体免疫力研究[J].*中国酿造*, 2019, 38(3): 18–22. [ZHOU Jiandi, ZHANG Lei, QIAN Bin, et al. Enhancement of body immunity by functional Huangjiu[J]. *China Brewing*, 2019, 38(3): 18–22.]
- [9] 张佳笑,王健,刘媛,等.复合酒曲发酵马铃薯酒的工艺优化[J].*中国酿造*, 2020, 39(3): 68–72. [ZHANG Jiaxiao, WANG Jian, LIU Yuan, et al. Optimization of fermentation technology of potato wine with compound Jiuqu[J]. *China Brewing*, 2020, 39(3): 68–72.]
- [10] 张元,白卫东,刘功良.黄酒生物活性成分及其功能研究进展[J].*中国酿造*, 2017, 36(7): 5–9. [ZHANG Yuan, BAI Weidong, LIU Gongliang. Research progress of bioactive components in Chinese rice wine and their functions[J]. *China Brewing*, 2017, 36(7): 5–9.]
- [11] ZHU F B, LI S, GUAN X, et al. Influence of vacuum soaking on the brewing properties of japonica rice and the quality of Chinese rice wine[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 130(2): 159–165.
- [12] JIAO A Q, XU X M, JIN Z Y. Research progress on the brewing techniques of new-type rice wine[J]. *Food Chemistry*, 2017, 215: 508–515.
- [13] 石黎琳,李安,牟方婷,等.不同品种小米对黄酒风味影响的研究[J].*中国酿造*, 2021, 40(3): 54–63. [SHI Lilin, LI An, MU Fangting, et al. Effect of different kinds of millet on the flavor of Huangjiu[J]. *China Brewing*, 2021, 40(3): 54–63.]
- [14] 李杰,许彬,罗建成,等.红小米黄酒酿造工艺研究及体外抗氧化活性评价[J].*中国酿造*, 2021, 40(7): 123–129. [LI Jie, XU Bin, LUO Jiancheng, et al. Brewing technology and *in vitro* antioxidant activity evaluation of red-millet Huangjiu[J]. *China brewing*, 2021, 40(7): 123–129.]
- [15] 鞠乐,强学杰,牛银亭,等.南阳地区谷子产业现状及发展对策的研究与探讨[J].*大麦与谷类科学*, 2017, 34(3): 45–47. [JU Le, QIANG Xuejie, NIU Yinting, et al. The present status of millet industry in Nanyang region and proposed strategies for its development[J]. *Barley and Cereal Sciences*, 2017, 34(3): 45–47.]
- [16] 陈林玉,宋乐园,王云雨,等.红小米化学成分与营养成分分析[J].*食品科学*, 2021, 42(18): 218–224. [CHEN Linyu, SONG Leyuan, WANG Yunyu, et al. Analysis of chemical and nutritional components of red millet[J]. *Food Science*, 2021, 42(18): 218–224.]

- [17] 蔡乔宇, 周坚, 缪礼鸿, 等. 黄酒专用米的研究进展[J]. *中国酿造*, 2018, 37(6): 1-5. [CAI Qiaoyu, ZHOU Jian, MIAO Lihong, et al. Research progress of specific rice for Huangjiu production[J]. *China Brewing*, 2018, 37(6): 1-5.]
- [18] 洪家丽, 李秋艺, 潘雨阳, 等. 红曲黄酒传统酿造过程挥发性风味组分及微生物菌群多样性分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(12): 137-144. [HONG Jiali, LI Qiuyi, PAN Yuyang, et al. Changes in volatile metabolites and microbial community dynamics during the traditional brewing of Hongqu glutinous rice wine[J]. *Food Science*, 2019, 40(12): 137-144.]
- [19] 陈蒙恩, 侯建光, 张振科, 等. 陶融型大曲微生物多样性与挥发性风味成分的相关性研究[J]. *中国酿造*, 2020, 39(10): 54-60. [CHEN Mengen, HOU Janguang, ZHANG Zhenke, et al. Correlation between microbial diversity and volatile flavor components of Taorong-type Daqu[J]. *China brewing*, 2020, 39(10): 54-60.]
- [20] 严超. 红枣白兰地发酵过程中细菌群落结构与风味物质的相关性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2018. [YAN Chao. Bacterial communities and profile of aroma compounds: A correlation study in the process of jujube brandy fermentation[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2018.]
- [21] LI S P, LIANG J J, MA Y L, et al. Physicochemical properties of red millet: A novel Chinese rice wine brewing material[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2021, 45(6): e15556.
- [22] 赵凯, 许鹏举, 谷广烨. 3, 5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. *食品科学*, 2008(8): 534-536. [ZHAO Kai, XU Pengju, GU Guangye. Study on determination of reducing sugar content using 3,5-dinitrosalicylic acid method[J]. *Food Science*, 2008(8): 534-536.]
- [23] YU H, XIE T, XIE J, et al. Characterization of key aroma compounds in Chinese rice wine using gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry[J]. *Food Chemistry*, 2019, 293: 8-14.
- [24] 母应春, 姜丽, 苏伟. 应用 Illumina 高通量测序技术分析 3 种酒曲中微生物多样性[J]. *食品科学*, 2019, 40(14): 115-122. [MU Yingchun, JIANG Li, SU Wei. Analysis of microbial diversity in three rice wine kojis by Illumina high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2019, 40(14): 115-122.]
- [25] LIU S, YANG L, ZHOU Y, et al. Effect of mixed moulds starters on volatile flavor compounds in rice wine[J]. *LWT*, 2019, 112: 108215.
- [26] 孙剑秋, 邹慧君, 谢广发. 黄酒酿造学[Z]. 北京: 科学出版社, 2019, 2-127. [SUN Jianqiu, ZOU Huijun, XIE Guangfa. Huangjiu brewing[M]. BeiJing: Science Press, 2019, 2-127.]
- [27] 朱小芳, 张凤杰, 俞剑葵, 等. 黄酒浸米水中细菌群落结构及优势菌代谢分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(10): 82-86. [ZHU Xiaofang, ZHANG Fengjie, YU Jianshen, et al. Analysis of microbial community structure and metabolic characteristics of dominant microbes in rice milk for yellow wine[J]. *Food Science*, 2017, 38(10): 82-86.]
- [28] CAI H Y, ZHANG T, ZHANG Q, et al. Microbial diversity and chemical analysis of the starters used in traditional Chinese sweet rice wine[J]. *Food Microbiology*, 2018, 73: 319-326.
- [29] GONG M, ZHOU Z L, JIN J S, et al. Effects of soaking on physicochemical properties of four kinds of rice used in Huangjiu brewing[J]. *Journal of Cereal Science*, 2020, 91: 102855.
- [30] WEI X L, LIU S P, YU J S, et al. Innovation Chinese rice wine brewing technology by bi-acidification to exclude rice soaking process[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 123(4): 460-465.
- [31] 油卉丹. 不同种类大米黄酒酿造的差异性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017. [YOU Huidan. Characterization of the difference among Chinese rice wine brewed from different varieties of rice[D]. WuXi: Jiangnan University. 2017, 56.]
- [32] 杨辉, 赵敏, 王婷婷, 等. 米酒酿造用大米和酒曲的筛选[J]. *陕西科技大学学报*, 2020, 38(6): 34-39. [YANG Hui, ZHAO Min, WANG Tingting, et al. Screening of rice and distiller's yeast for rice wine brewing[J]. *Journal of Shanxi University of Science & Technology*, 2020, 38(6): 34-39.]
- [33] 刘小雨, 李科, 张惟广. 纯种发酵和混菌发酵对野木瓜果酒品质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(10): 134-140. [LIU Xiaoyu, LI Ke, ZHANG Weiguang. Effects of pure and mixed fermentation on the quality of stauntonia chinensis wine[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2018, 44(10): 134-140.]
- [34] 罗涛, 范文来, 徐岩, 等. 我国江浙沪黄酒中特征挥发性物质香气活力研究[J]. *中国酿造*, 2009(2): 14-19. [LUO Tao, FAN Wenlai, XU Yan, et al. Aroma components in Chinese rice wines from different regions[J]. *China Brewing*, 2009(2): 14-19.]
- [35] 陈双, 罗涛, 徐岩, 等. 我国黄酒酵母和酿酒原料对黄酒中 β -苯乙醇含量的影响[J]. *中国酿造*, 2009(4): 23-26. [CHEN Shuang, LUO Tao, XU Yan, et al. Effects of yeast strains and raw materials on β -phenylethanol production in Chinese rice wines[J]. *China Brewing*, 2009(4): 23-26.]
- [36] WOLIŃSKA A, KUŹNIAR A, ZIELENKIEWICZ U, et al. Indicators of arable soils fatigue-bacterial families and genera: A metagenomic approach[J]. *Ecological Indicators*, 2018, 93: 490-500.
- [37] 宁亚丽, 吴跃, 何婧, 等. 基于高通量测序技术分析朝鲜族传统米酒及其酒曲中微生物群落多样性[J]. *食品科学*, 2019, 40(16): 107-114. [NING Yali, WU Yue, HE Qiang, et al. Analysis of microbial community diversity in Chinese Korean traditional rice wine and its starter culture using high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2019, 40(16): 107-114.]
- [38] 邢敏钰. 芝麻香型白酒发酵过程中乳酸菌群结构及功能[D]. 无锡: 江南大学, 2017. [XING Minyu. Community struction and function of lactic acid bacteria during fermentation process for sesame-flavor liquor making[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.]
- [39] LI Z M, BAI Z H, WANG D L, et al. Cultivable bacterial diversity and amylase production in three typical daqus of Chinese spirits[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014, 49(3): 776-786.
- [40] 陈雪, 张永利, 闫宗科, 等. 凤香型酒醅微生物群落演替及其与理化指标的相关性分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(22): 200-205. [CHEN Xue, ZHANG Yongli, YAN Zongke, et al. Correlation analysis of microbial community succession in fermented grains of Xifeng-flavor Chinese liquor with its physicochemical indexes[J]. *Food Science*, 2020, 41(22): 200-205.]
- [41] 林少华, 贾红亮, 李星宇, 等. 牛奶酒酿造过程中微生物多样

- 性的动态变化[J]. *中国奶牛*, 2020(4): 39–43. [LIN Shaohua, JIA Hongliang, LI Xingyu, et al. Study on dynamic changes of microbial diversity in milk wine brewing process[J]. *Milk and Milk Product*, 2020(4): 39–43.]
- [42] 冯莉, 陈雪, 李丽, 等. 5 株克鲁维毕赤酵母的酿造学特性[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(12): 66–73. [FENG Li, CHEN Xue, LI Li, et al. The enology characteristics of five strains of *Pichia kluyveri*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(12): 66–73.]
- [43] 李凯敏, 付桂明, 吴酬飞, 等. 特香型白酒酿造过程中真核微生物菌群演替[J]. *食品科学*, 2017, 38(22): 131–136. [LI Kaimin, FU Guiming, WU Choufei, et al. Dynamics of eukaryotic microbial community succession during the traditional fermentation of special-flavor liquor[J]. *Food Science*, 2017, 38(22): 131–136.]
- [44] 李欣, 王彦华, 林静怡, 等. 高通量测序技术分析酱香型白酒酒醅的微生物多样性[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2017, 33(1): 51–59. [LI Xin, WANG Yanhua, LIN Jingyi, et al. Analysis of microbial diversity in the fermented grains of maotai-flavor liquor using high-throughput sequencing[J]. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2017, 33(1): 51–59.]
- [45] WANG H Y, GAO Y B, FAN Q W, et al. Characterization and comparison of microbial community of different typical Chinese liquor Daqu by PCR-DGGE[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2011, 53(2): 134–140.
- [46] 马琳娜, 邱树毅, 王啸. 不同黄酒酒曲的酿造微生物与风味物质之间的关系[J]. *食品与发酵科技*, 2021, 57(3): 81–89. [MA Linna, QIU Shuyi, WANG Xiao. Relationship between brewing microorganisms and flavor compounds in different rice wine Jiuqu[J]. *Food and Fermentation Sciences & Technology*, 2021, 57(3): 81–89.]
- [47] 庞晓娜. 环境微生物对清香型白酒特征风味物质的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2018. [PANG Xiaona. Effect of environment microbiota on the characterized flavor compounds of light-flavor Baijiu[D]. Beijing: China Agricultural University, 2018.]
- [48] 马龙. 开菲尔发酵过程中微生物与挥发性风味物质的相关性[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学, 2020. [MA Long. Correlation between microbial diversity and volatile flavor compounds in kefir fermentation process[D]. Urumqi: Xinjiang Normal University, 2020.]
- [49] 郑亚伦, 赵婷, 王家胜, 等. 数字化高温大曲发酵过程中微生物群落结构的变化[J]. *食品科学*, 2022, 43(12): 171–178. [ZHENG Yalun, ZHAO Ting, WANG Jiasheng, et al. Changes in the microbial community structure during the digitally managed fermentation of high-temperature Daqu[J]. *Food Science*, 2022, 43(12): 171–178.]